

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA DEGRADADORA DE FENOL DA ZONA INDUSTRIAL DE CUBATÃO-SP, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO DO 16S

Ingrid Regina Avanzi \*, Louise Hase Gracioso \*\*, Elen Aquino Perpetuo \*\*\*

*\*Acadêmica da Faculdade de Ciências e de Tecnologia da Universidade Santa Cecília; bolsista do Programa Universidade para Todos – PROUNI; aluna de Iniciação Científica do Centro de Pesquisa e Capacitação em Meio Ambiente - CEPEMA-USP, Cubatão-SP; \*\*Acadêmica da Faculdade de Ciências e de Tecnologia da Universidade Santa Cecília; aluna de Iniciação Científica do Centro de Pesquisa e Capacitação em Meio Ambiente - CEPEMA-USP, Cubatão-SP; \*\*\*Pesquisadora associada do Centro de Pesquisa e Capacitação em Meio Ambiente - CEPEMA-USP, Cubatão-SP.*

**RESUMO.** O fenol está presente em efluentes de indústrias de gaseificação de carvão, produção de coque, farmacêutica, pesticidas, fertilizantes, produção de tintas, química sintética e polpa de papel. O fenol em altas concentrações é tóxico a organismos vivos. No Brasil, os padrões de qualidade de água estabelecem concentrações de fenol de até 3 mg/L para águas de classe I (destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral. Os padrões de emissão correspondem a valores de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (CONAMA, 2005). O presente trabalho pretende isolar e identificar microrganismos presentes no meio ambiente e que tenham capacidade de degradar o fenol e também outros aromáticos. A eficiência destes microrganismos foi comparada àqueles tradicionalmente utilizados para a degradação do fenol em reatores biológicos (lodo biológico adaptado). Muitas enzimas já foram identificadas no genoma de bactérias com capacidade de degradação de xenobióticos, dentre elas, fenol-monooxigenases, catecol -dioxigenases, além de outras. Estes microrganismos foram colocados em um mini-reator biológico para a degradação do fenol e seus intermediários (catecol e hidroquinona).

**Palavras-chave.** Biodegradação; fenol; amplificação do 16S.

## Introdução

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo tóxico de poluentes ambientais descartados do processo de muitas indústrias, tais como refinarias de óleo e indústrias químicas. Alguns destes componentes são listados como os principais poluentes do meio ambiente pelas agências de proteção ambiental de vários países. Muitos microrganismos são capazes de utilizar os compostos aromáticos como fonte primária de carbono e energia, transformando-os em produtos menos tóxicos. Sem dúvida, os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais freqüentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluentes transformando compostos orgânicos tóxicos em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, com custos relativamente baixos. Porém, o tratamento biológico pode apresentar limitações, devido à baixa biodegradabilidade e alta toxicidade do fenol e de alguns de seus derivados. Por esta razão, um grande número de bactérias que degradam fenol em altas concentrações, têm sido isoladas e suas vias de degradação estudadas. Grande parte da informação da via metabólica da degradação de compostos aromáticos vem do isolamento e seleção de cepas bacterianas (Takeo *et al.*, 2006). A degradação aeróbia de um composto fenólico é iniciada através de sua hidroxilação para então formar catecol (Harayama *et al.*, 1992). Este passo é catalisado pela fenol hidroxilase (fenol 2-monooxigenase, E.C. 1.14.13.7), o qual é considerado um passo limitante na via degradativa. Existem 2 tipos de fenol hidroxilases bacterianas, uma uni-componente e outra multi-componente. Entre elas, a fenol hidroxilase multi-componente (mPH) é considerada a maior enzima existente no meio ambiente natural (Futamata *et al.*, 2001). O presente trabalho visa a seleção de microrganismos presentes em ambientes contaminados e com alto potencial para degradação de fenol. A escolha da metodologia de amplificação do DNAr 16S para identificação destes microrganismos, decorreu do fato dele apresentar um marcador molecular ideal, pois possui uma distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os taxa e permite o aparecimento de divergências na seqüência. Além disso, sua estrutura primária possui uma alternância entre as regiões mais e menos conservadas, permitindo a investigação de um amplo espectro de distâncias filogenéticas, desde o nível de domínio até o nível de espécie (Ludwig & Schleifer, 1994).

## Objetivo

Isolar e identificar linhagens de microrganismos presentes no meio ambiente e que tenham capacidade de degradar o fenol.

## Metodologia

Neste experimento, a seleção de microrganismos tolerantes e com potencial para utilização do fenol como fonte de carbono, foi realizada através de crescimento em meio mínimo mineral (10 mL de FeSO<sub>4</sub> a 1 mM, 1mL de MgSO<sub>4</sub> a 1 M, 0,5 mL de CaCl<sub>2</sub> a 1M e 10 mL de M2 - NH<sub>4</sub>Cl 5g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,4g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,6g) contendo 25 mg.L<sup>-1</sup> de fenol à temperatura ambiente. A avaliação do crescimento foi feita após 30 dias e os microrganismos foram plaqueados em meio mínimo mineral sólido contendo concentrações crescentes de fenol (25, 50, 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup> de fenol). A linhagem isolada foi utilizada nos ensaios de biodegradação que envolviam: crescimento celular, consumo de fenol e identificação de seus intermediários. Esta linhagem foi identificada através de extração do DNA baseando-se no protocolo de Chen & Kuo (1993). A amplificação foi realizada

Revista Ceciliana 1(2): 66-70, 2009

através de PCR e consistiu de 0,3 µL do DNA genômico, 0,2 µL da enzima Taq-polimerase (1 unidade), 5 µL do tampão da enzima Taq (GE), 1 µL dNTPs (10mM), 1 µL do primer 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'), 1 µL do primer 1401R (5'CGGTGTGTACAAGACCC 3'). As amostras foram submetidas a 30 ciclos de 95°C por 1 min., 61°C por 30 seg., 72°C por 50 seg. em um termociclador. A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 1% de agarose, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Uma sequência do gene 16S contendo 908 pares de bases foi obtida em ambas as direções para esta cepa, utilizando-se o seqüenciador de DNA ABI modelo 310 A (Applied Biosystems) e o kit de seqüenciamento ABI Prism (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, Perkin-Elmer). A seqüência de nucleotídeos do gene que codifica o RNAr 16S foi comparada com o banco de dados do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A eficiência na degradação de fenol foi comprovada através de ensaios enzimáticos em meio mínimo mineral contendo fenol como única fonte de carbono em concentrações de até 800 mg.L<sup>-1</sup> de fenol. Amostras foram retiradas diariamente e analisadas em HPLC (Shimatzu), e seu crescimento celular observado em espectrofotômetro (Shimatzu), a λ=600nm.

## Resultados e Discussão

A seqüência obtida foi comparada com seqüências do banco de dados (BLAST, GenBank) e apresentou 95% de homologia com *Pseudomonas aeruginosa*. Muitas das bactérias que possuem capacidade de degradar compostos aromáticos são Gram negativas, sendo que a melhor representante desta classe é da família Pseumonadaceae. Diversas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e outros gêneros relacionados (*Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, etc) têm sido identificados como tendo ampla capacidade de degradação de compostos aromáticos (Chen et al., 2004, Thakur et al., 2002). Estas bactérias Gram-negativas são excepcionalmente versáteis e são conhecidas pelas suas atividades metabólicas que permitem que algumas delas cresçam em condições extremas de limitação de nutrientes. Além disso, são capazes de adquirir rapidamente a capacidade de degradar compostos xenobióticos quando expostas a estes compostos e na ausência de fontes de nutrientes mais facilmente degradáveis. Por isso, encontram-se frequentemente envolvidas em diversos processos de biorremediação. Ensaio de biodegradação e crescimento em fenol como única fonte de carbono, demonstraram que esta cepa foi capaz de consumir até 800 mg.L<sup>-1</sup> de fenol em apenas 24h, restando como principal intermediário, mesmo assim em baixa concentração, a hidroquinona (fig.01). Este resultado sugere que a enzima envolvida realiza uma *para*-hidroxilação, fato bastante incomum na via degradativa de bactérias, que normalmente hidroxilam, através da enzima fenol-hidroxilase (E.C. 1.14.13.7) na posição *orto*-, formando catecol como principal intermediário (Futamata et al., 2001). O crescimento celular e a degradação de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de fenol foi observada (fig.02) durante uma semana.

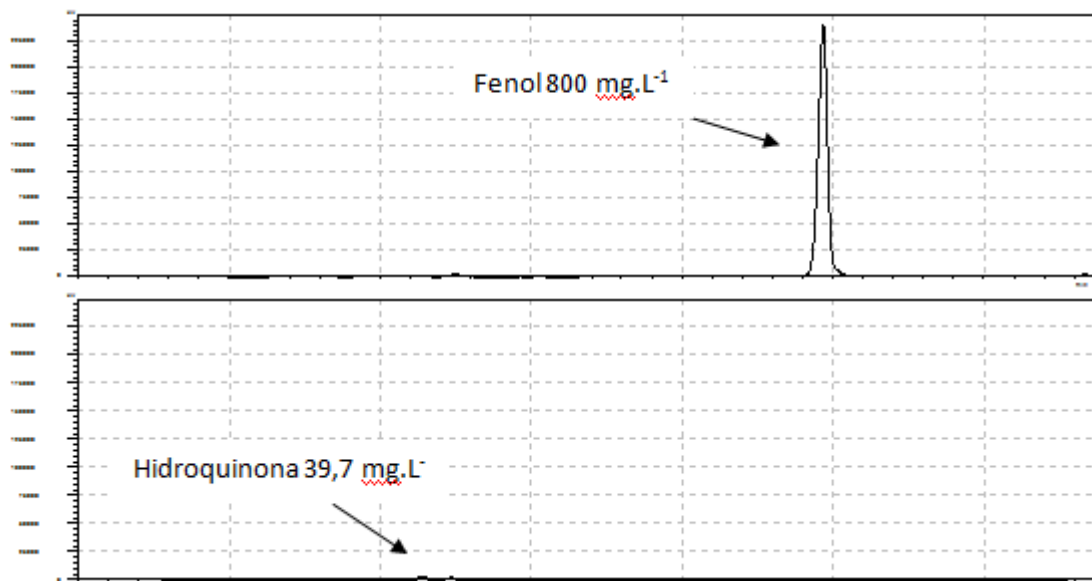


Fig.01. Cromatograma da biodegradação do fenol ( $800 \text{ mg.L}^{-1}$ ) pela bactéria isolada e formação de sub-produto (hidroquinona). Remoção de 100% da concentração inicial de fenol após 24h de incubação.

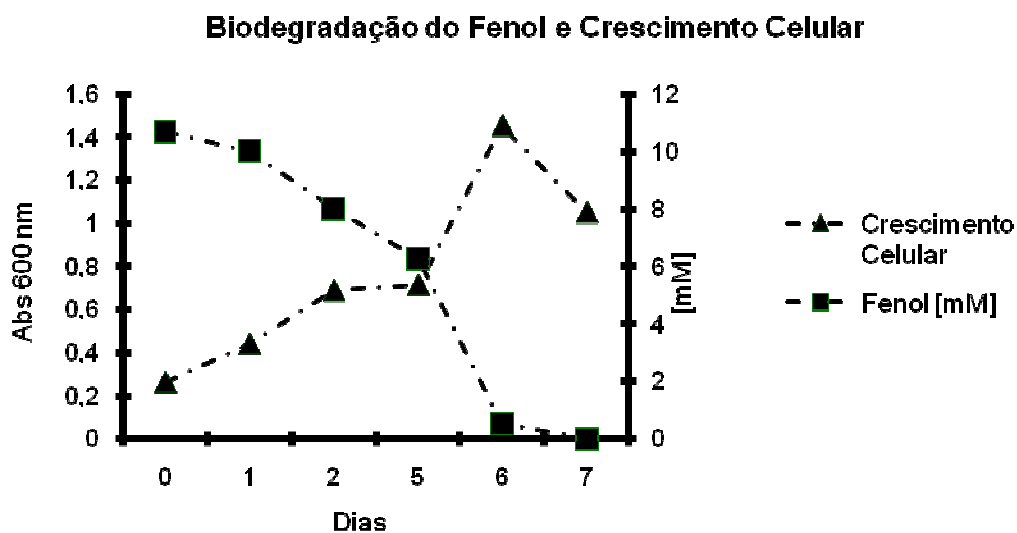


Fig.02. Efeitos da concentração de 10 mM de fenol (equivalente a  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sobre a bactéria isolada do meio ambiente. Concentração do fenol analisada em HPLC e crescimento celular medido através da absorbância em 600 nm.

## Conclusão

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolada da zona industrial de Cubatão-SP apresenta alta tolerância à toxicidade do fenol e conseqüentemente pode ter potencial aplicação no biotratamento de efluentes contendo altas concentrações de compostos fenólicos ou em biorremediação de solos *in situ*.

## Referências Bibliográficas

CHEN, W. & Kuo, T. (1993), A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. **21 (9)**: 2260.

CHEN W.M.; Chang J.S.; Wu C.H.; Chang S.C. Characterization of phenol and TCE degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in Microbiology*. **155**: 672-680 (2004).

CONAMA (2005), Resolução nº 357, 17 de Março de 2005.

HARAYAMA S.; Kok M.; Neidle E.L.; (1992), Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology*. **46**: 565-601.

FUTAMATA H.; Harayama S.; Watanabe K. (2001), Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10): 4671- 4677.

LUDWIG, W.; Schleifer K. H. (1994), Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **15**: 155-173.

SAMBROOK R, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual 2ed. In: *Cold Spring Harbour (Ed): Cold Spring Harbour Laboratory* 3 v.

TAKEO M.; Prabu, S.K.; Kitamura C.; Hirai M.; Takahashi H.; Kato D.; Negoro, S. (2006), Characterization of alkylphenol degradation gene cluster in *Pseudomonas putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenols and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **102** (4): 352-361.

THAKUR I.S.; Venna P.; Upadhayaya K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **290**: 770-74 (2002).